

E. Zusammenfassung:**Prinzip:**

Die vorliegende Arbeit untersucht die Wirkungen von Glykosaminoglykanen (GAG) auf eine aus der Leber von Ratten aufgereinigte cAMP-abhängige Proteinkinase (PKA).

Methodisches Vorgehen:

Zur Bestimmung der Aktivität der PKA wurde das Enzym (Endkonzentration im Inkubationsansatz: 0,3 mg/ml) zusammen mit dem Substrat Histon (1,0 mg/ml Konzentration im Ansatz) und den anderen Reaktionskomponenten (+/- cAMP) des Standardinkubationsansatzes für 10 Minuten bei 30°C inkubiert. Nach Beendigung der Reaktion wurde dann die Radioaktivität der ³²P markierten Histon-Moleküle in die katalytische Aktivität der PKA umgerechnet, indem die Differenz aus der Enzym-Aktivität in An- bzw. Abwesenheit von cAMP gebildet wurde.

Die Wirkungen der GAG auf die katalytische Aktivität der PKA wurden im Vergleich zu Kontrollansätzen (ohne Zugabe von GAG) untersucht.

Agentien:

Diesem beschriebenen Inkubationsansatz wurden die GAG Chondroitin-4-sulfat (C4S), Chondroitin-6-sulfat (C6S), Dermatansulfat (DS), Keratansulfat (KS), Hyaluronsäure (HA) und Heparansulfat (HS) in ansteigenden Konzentrationen zugesetzt (10 bis 600 mg/l).

Befunde:

Die GAG zeigten konzentrationsabhängige, inhibierende Effekte auf die PKA katalysierte Histonphosphorylierung. Weiterhin konnte festgestellt werden, daß das Ausmaß der Inhibierungen neben der Konzentration noch von dem zugesetzten GAG und damit von dessen Struktur beeinflußt wurde.

So hemmte HS die PKA-Aktivität am stärksten, während das GAG HA die geringsten inhibitorischen Effekte auf die katalytische Aktivität des Enzyms hatte. Die GAG lassen sich aufgrund des Ausmaßes der inhibierenden Wirkungen in folgende Reihenfolge einordnen:

$$HA < KS < C4S < C6S < DS < HS$$

Untersuchungen zur Beurteilung der Effekte der GAG konnten belegen, daß die unterschiedliche Beeinflussung der PKA-Aktivität durch das Molekulargewicht und den polyanionischen Charakter der eingesetzten Testsubstanzen bedingt ist.

Die Ergebnisse aus den reaktionskinetischen Experimenten mit DS und HA zeigten, daß die Interaktionen der GAG mit der PKA, die zur Hemmung der Aktivität des Enzyms führen, vorwiegend durch einen nicht-kompetitiven Mechanismus verursacht wurden, wobei dabei zu vermuten ist, daß die GAG die Interaktion des Substrates mit dem Enzym beeinflussen, insofern bei einer Erhöhung der Konzentration des Substrates die inhibierenden Effekte von HA und DS verschwunden sind.

Da die GAG als Bestandteile der extrazellulären Matrices diverse Funktionen innerhalb der Gewebe haben, ist zu vermuten – bezogen auf die beschriebenen Effekte auf die cAMP-abhängige Proteinkinase -, daß die GAG zu einer weiteren Gruppe von Substanzen gehören, die die Aktivität der PKA regulieren können. Dieser Regulationsmechanismus würde dadurch z.B. die Zell-Zell- und Zell-Matrix-Interaktionen, die auch vom cAMP-abhängigen Signalübertragungsweg kontrolliert werden, beeinflussen.

F. Summary:

Krischek, C: **Modifikation of the cAMP-dependent Protein kinase from rat liver by glycosaminoglycans (an in vitro studie)**

Principle:

This paper investigates the effects of different glycosaminoglycans (GAGs) upon the cAMP-dependent Protein kinase (PKA) purified from rat livers.

Methods:

For determination of the PKA activity the enzyme (protein concentration in the set-up: 0,3 mg/ml) was incubated at 30°C for 10 minutes with the substrate histone (concentration in the set-up: 1,0 mg/ml) and the other components of the standard incubation set-up in the presence and absence of cAMP. After ceasing the incubation reaction the radioactivity of the ³²P-molecules bound to the histones was determined. The PKA activity was calculated as the difference between the measured enzyme activity in the presence and absence of cAMP.

The effects of the GAG on the catalytic activity of the PKA were examined in comparison with control set-ups (without added GAG).

Agents:

Chondroitin-4-sulphate (C4S), chondroitin-6-sulphate (C6S), dermatan sulphate (DS), keratan sulphate (KS), hyaluronic acid (HA) and heparan sulphate (HS) were added to the described standard incubation set-up (concentrations between 10 and 600 mg/l)

Results:

The GAG showed inhibitory effects to the PKA catalysed histone phosphorylation depending on the concentration of the added GAG. The amount of inhibition was mainly affected by the structure of the GAGs.

HS inhibits the activity of the PKA with the highest extent, whereas HA affects the enzyme least. According to the inhibitory effects the GAGs can be listed as follows:

$$\text{HA} < \text{KS} < \text{C4S} < \text{C6S} < \text{DS} < \text{HS}$$

Investigations to evaluate the effects of the GAGs gave evidence, that the inhibition of the catalytic activity of PKA depends on the molecular weight and the polyanionic structures of the GAG.

Further reaction kinetic studies with HA and DS showed, that the interactions between the GAGs and the PKA influencing the reduction of the enzyme activity depend mainly on a non-competitive inhibition mechanism. It could be assumed that the GAGs affect the interaction between the enzyme and the substrate, as an increase of substrate concentration overcame the inhibitory effects of HA and DS.

In respect to the physiological functions of GAGs as components of the extracellular matrix these results suppose that the GAG belong to a further class of substances regulating the PKA. By this they probably affect the cell-cell- and cell-matrix interactions regulated by the cAMP dependent Protein kinase.